

学校编码：10384
学号：24520081153448

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

质粒 pLXSN 介导 CGRP 基因治疗大鼠蛛网
膜下腔出血后脑血管痉挛的研究

Plasmid pLXSN-mediated transfer of CGRP gene affects
cerebral vasospasm after Subarachnoid hemorrhage in rat
model

丰 伟

指导教师姓名：田新华 教授
专 业 名 称：外科学（神经外科学）
论文提交日期：2011 年 4 月
论文答辩时间：2011 年 5 月
学位授予日期：2011 年 月

答辩委员会主席：_____
评 阅 人：_____

2010 年 5 月

质粒 pLXSN 介导 CGRP 基因治疗大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的研究

丰伟

指导教师 田新华 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
缩略语	V
前 言.....	1
第一章 构建携带 CGRP 基因的质粒 PLXSN-CGRP	4
1.1 引言	4
1.2 实验材料及仪器	5
1.3 实验方法	6
1.4 实验结果	11
1.5 实验讨论	11
1.6 本章小结	18
第二章 载体 PLXSN-CGRP 体外转染真核细胞的研究	19
2.1 引言	19
2.2 实验材料及仪器	20
2.3 实验方法	21
2.4 实验结果	26
2.5 实验讨论	31
2.6 本章小结	31
第三章 侧脑室注射 PLXSN-CGRP 对蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的影响.....	32
3.1 引言	32
3.2 实验材料及仪器	33
3.3 实验方法	34
3.4 实验结果	37

3.5 实验讨论	42
3.6 本章小结	42
全 文 总 结	43
参 考 文 献	44
综述.....	49

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Abbreviation.....	V
Introduction.....	1
Chapter1 Constrection of recombinant plasmid vector pLXSN-CGRP.....	4
1.1 Introduction.....	4
1.2 Materials and Instruments.....	5
1.3 Experimental.....	6
1.4 Results.....	11
1.5 Dissctssion.....	11
1.6 Conclusions.....	18
Chapter2 Studies on transfection into eukaryocyte of plasmid vector pLXSN-CGRP in vitro.....	19
2.1 Introduction.....	19
2.2 Materials and Instruments.....	20
2.3 Experimental.....	21
2.4 Results.....	26
2.5 Dissctssion.....	31
2.6 Conclusions.....	31
Chapter 3 Effects of intraventricularly injecting pLXSN-CGRP to CVS after SAH in rat.....	32
3.1 Introduction.....	32
3.2 Materials and Instruments.....	33
3.3 Experimental.....	34
3.4Results.....	37
3.5Dissctssion.....	42
3.6 Conclusions.....	42
Conclusions.....	43

References.....	44
Review	54

厦门大学博硕

质粒 pLXSN 介导 CGRP 基因治疗大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的研究

摘 要

目 的：构建带有降钙素基因相关肽基因的重组真核表达质粒 pLXSN-CGRP。枕大池一次注血法制作大鼠蛛网膜下腔出血模型，以质粒 pLXSN 作为载体携带 CGRP cDNA 经立体定向侧脑室注入，观察蛛网膜下腔出血后基底动脉的痉挛程度及血浆 CGRP 蛋白的表达，探讨质粒 pLXSN 介导 CGRP 基因在蛛网膜下腔出血（SAH）后脑血管痉挛（CVS）中的保护作用，为临床治疗脑血管痉挛提供新的思路和实验依据。

方 法：本实验以 350g 普通成年雄性 SD 大鼠为取材对象，从大鼠大脑皮层中获取总 RNA，通过 RT-PCR 扩增得到 CGRP 基因全序列。通过双酶切、连接反应将 CGRP 基因导入质粒 pLXSN 载体上。通过转化、筛选、鉴定，成功构建重组质粒 pLXSN-CGRP。体外转染人胚胎肾细胞 293T，荧光定量 PCR、Western-blotting 检测 CGRP 的表达。提取及扩增质粒 pLXSN 和质粒 pLXSN-CGRP。将 36 只 300g-350g 普通成年雄性 SD 大鼠均采用枕大池一次注血法制成大鼠蛛网膜下腔出血模型。随机分为 3 组：生理盐水组(n=12)、空载质粒组(n=12)和 CGRP 组(n=12)，采用立体定位的方式于 SAH 后立即经侧脑室分别注入生理盐水、质粒 pLXSN 和质粒 pLXSN-CGRP 20ul。HE 染色法检测 SAH 后 24 小时各组基底动脉形态学改变，采用显微图像分析系统采集、分析各组标本图像。酶联免疫吸附测定法（Ellisa）分析各组血浆中 CGRP 蛋白的表达水平。

结 果：1、成功通过 RT-PCR 扩增得到 CGRP 目的基因序列，全长 387bp；2、成功构建重组质粒 pLXSN-CGRP，并转染 293-T 细胞，通过 Q-PCR 及 Western-blot 检测确认降钙素基因相关肽的表达；3、枕大池一次注血法成功制作大鼠蛛网膜下腔出血模型并探讨优化模型条件；4、与对照生理盐水动物组、空载质粒动物组相比，经 pLXSN-CGRP 质粒干预的实验动物组基底动脉痉挛程度较轻，表现为血管管腔内周长增加，血管壁厚度减小，有显著性差异($P < 0.05$)；pLXSN-CGRP 质粒干预的实验动物组浆中 CGRP 蛋白表达量也显著性增大 ($P < 0.05$)。

结 论：体外构建携带 CGRP 基因的重组真核表达质粒 pLXSN-CGRP，转染

293-T 细胞后发现 CGRP 蛋白表达，经侧脑室注射导入 SAH 后 CVS 的大鼠模型内，在蛛网膜下腔出血早期就可以对比观察到脑血管痉挛得到有效地缓解。外源性基因导致 CGRP 表达量增高可能成为其主要机制。

关键词:蛛网膜下腔出血；质粒；CGRP；脑血管痉挛

厦门大学博硕

Plasmid pLXSN-mediated transfer of CGRP gene affects cerebral vasospasm after Subarachnoid hemorrhage in rat model

Abstract

Objective: It is to construct the recombinant plasmid vector pLXSN-CGRP that codes calcitonin gene-related peptide (CGRP) of rat. Observe whether CGRP gene can release cerebral vasospasm and improve the expression of CGRP by intraventricular injection in Subarachnoid hemorrhage rat model.

Methods: The total RNA was extracted from the brain tissue of rat with Trizol reagent, and the cDNA of rCGRP was amplified by RT-PCR. The PCR products and pLXSN were digested with restriction enzymes, purified and ligated. We transfected the recombinant plasmid vector pLXSN-CGRP into 293T cell in vitro. Q-PCR and Western-blotting were used to detect the expression of CGRP. SAH model was introduced by injecting autologous blood into cisterna magna. Animals were randomly divided into 3 groups (saline group, pLXSN group and CGRP gene treated group). We injected drug (saline or plasmid) intraventricularly while we established the SAH model. The degree of cerebral vasospasm and the expression level of CGRP were detected.

Results: (1) Electrophoretic analysis of RT-PCR product : the amplified products of RT-PCR presented a specific band that was coincided with the size of rCGRP cDNA ; (2) The recombinant plasmid vector pLXSN-CGRP was constructed successfully which we transfected into 293T cell. We discovered the expression of CGRP in vitro through Q-PCR and Western-blotting. (3) The model was successfully established by injecting autologous blood into cisterna magna. (4) The pathological damage of basal artery was much more severe and the degree of cerebral vasospasm increased in CGRP gene treated group ($P < 0.05$). The expression of CGRP was significantly increased in CGRP gene treated group ($P < 0.05$).

Conclusion: Our study demonstrated CGRP gene can release cerebral vasospasm

and increase expression of CGRP by intraventricular injection in the rat SAH model.

Keyword: Subarachnoid hemorrhage (SAH); CGRP; Cerebral vasospasm; Plasmid

厦门大学博硕

缩略语 (Abbreviation)

CVS	Cerebral vasospasm	脑血管痉挛
SAH	Subarachnoid hemorrhage	蛛网膜下腔出血
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	降钙素基因相关肽

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕